



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**

MAYARA OLIVEIRA DIOGO

**RELATO DE CASO: ANÁLISE DE VARIAÇÕES CROMOSSOMICAS EM
PACIENTES COM INDICAÇÃO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

**Goiânia
2019**

MAYARA OLIVEIRA DIOGO

**RELATO DE CASO: ANÁLISE DE VARIAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM
PACIENTES COM INDICAÇÃO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Cláudio Carlos da Silva

**Goiânia
2019**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO

Aluno(a): MAYARA OLIVEIRA DIOGO

Orientador(a): Dr. CLÁUDIO CARLOS DA SILVA

Membros:

1. Dra. LYSA BERNARDES MINASI

2. Dra. FERNANDA RIBEIRO GODOY

3. Dr. APARECIDO DIVINO DA CRUZ (Suplente)

D591r Diogo, Mayara Oliveira

Relato de caso : análise de variações cromossômicas em pacientes com indicação de síndrome mielodisplásica / Mayara Oliveira Diogo.-- 2019.

60 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, Goiânia, 2019

Inclui referências: f. 48-52

1. Trissomia. 2. Sangue - Doenças. 3. Cromossomos humanos - Anomalias. I. Silva, Cláudio Carlos da. II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas - Programa de Pós-Graduação em Genética - 2019. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 575.2 (043)

616.15

ATA COMPLEMENTAR Nº 152/2019

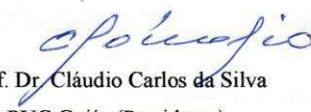
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

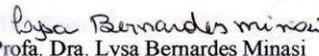
DISCENTE: MAYARA OLIVEIRA DIOGO

DEFENDIDA EM 27 DE MARÇO DE 2019 e Acreditada COM CONCEITO.....B

O título foi alterado () não (x) sim Relato de Caso: Análise da
Variação Cromossômica em Paciente
com Indicação de SMD.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
PUC Goiás (Presidente)


Profa. Dra. Lysa Bernardes Minasi
PUC Goiás


Profa. Dra. Fernanda Ribeiro Godoy
UFG

Dedico este trabalho à minha família que me apoiou nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é um sentimento de reconhecimento, uma emoção por saber que uma pessoa fez uma boa ação, um auxílio, em favor de outra. É uma das características mais importantes da fé cristã e deve ser levada no coração das pessoas.

Agradeço primeiramente a Deus pois tudo que conquistei na minha jornada foi ele que me proporcionou, sem ele eu não teria forças para essa caminhada.

A minha família, principalmente a minha mãe Maria Rosa Cavalcante de Oliveira, por todo esforço e dedicação para me proporcionar o melhor, que nesse caso foi a educação.

A pessoas especiais que me proporcionaram essa bênção que é esse mestrado, que são os professores Aparecido Divino da Cruz (Peixoto) e meu orientador Cláudio Carlos da Silva, acredito que foram pessoas usadas por Deus para abrir essa porta para mim.

Ao meu querido orientador Cláudio Carlos da Silva por toda paciência e compreensão, e ter tirado um pouco do seu precioso tempo para compartilhar seus conhecimentos comigo, que vem me ensinando desde a iniciação científica a ser um pedacinho do grande profissional que ele é.

E também ao meu namorado Nicolas Gustavo Matias de Oliveira, por todo apoio e compreensão nesses dias difíceis, e também toda ajuda com esse trabalho.

E em especial ao meu amigo Douglas Dantas Rodrigues (in memoriam) que teve papel fundamental na minha jornada, e sei que se pudesse ainda estaria, saudades.

Aos meus amigos por estarem do meu lado, não preciso nomeá-los porque sabem quem são, e que eu os amo.

Aos meus colegas de laboratório em especial Cristiano Luiz Ribeiro e Juliana Ferreira por toda contribuição com meu trabalho, sem vocês eu não conseguiria.

Não poderia deixar de agradecer a todos os professores do Mgene pelo conhecimento, aprendizado e principalmente amizade, pois vão além de professores, ensinam amor.

Aos pacientes do departamento de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás que aceitam doar suas amostras para este estudo.

E por fim agradeço a Pontifícia Universidade Católica, ao Mgene pela honra de fazer parte disso. Ao CNPq e a Capes pela colaboração financeira com o programa e a minha bolsa de estudos que foi fundamental para esse trabalho.

Tabelas, figuras e anexos	xi
Resumo	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Histórico	18
2.2 Síndrome Mielodisplásica	19
2.2.1 Aspectos Gerais.....	19
2.2.2 Diagnóstico Clínico e Laboratorial da SMD.....	20
2.2.3 Etiologia da SMD.....	22
2.2.4 Alterações Cromossômicas na SMD.....	28
2.3 Técnicas de Citogenética	30
2.3.1 Estudo do Cariótipo	32
2.3.2 FISH (Hibridização Fluorescente in Situ)	34
3 OBJETIVO	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4 MÉTODOS	38
4.1 Estratégia de Estudo	38
4.2 Grupo Amostral	39
4.3 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	39
4.4 Coleta e realização das técnicas laboratoriais	39
4.5 FISH (Hibridização In Situ por fluorescência	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS.....	50

8 ANEXOS55

FIGURAS

Figura 1. Células com anormalidades morfológicas típicas da SMD. Em [A] megaloblastos e eritroblastos anormalmente multinucleados, Em [B] maturação dissociada do núcleo e citoplasma. Em [C] siderablastos em anel, em [D] linhagem eritrocitária hipersegmentados neutrófilos hipossegmentados [D e E], grânulos reduzidos ou ausentes. Em [F] neutrófilos negativos na linha granulocitária e micro e megacariócitos, em [G] megacariócitos com múltiplos núcleos em forma de disco e [H] plaquetas gigantes..... Pág 22

Figura 2. Imagem que estabeleceu 46 como o número de cromossomos da espécie humana. Em [A] Metáfase e em [B] Pareamento cromossômico após a fixação e coloração com corante Giemsa (CANDEIAS, 2012, adaptada).....Pág 34

Figura 3. Resultado de FISH mostrando os sinais usados.....Pág 36

Figura 4. Fluxograma representando a sequência de atividades desenvolvidas na avaliação dos pacientes com SMD.....Pág 40

Figura 5. Hibridização Fluorescente “*in situ*” em células da medula óssea do paciente *ONCO 006*. Em [A] e em [B] núcleos interfásicos exibindo sinais fluorescentes vermelhos referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 17, indicando duas cópias e três cópias das regiões investigadas, respectivamente. Em [C] núcleos interfásicos exibindo sinais fluorescentes vermelhos referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 21, indicando duas cópias ou três cópias (seta) das regiões investigadas, respectivamente. Em [D] núcleo e metáfase exibindo duas cópias do cromossomo 21.....Pág 44

Figura 7. Hibridização Fluorescente “*in situ*” em células da medula óssea do paciente *ONCO 016*. Em [A] núcleo interfásico exibindo dois sinais fluorescentes verdes referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 15 (região

centromérica), indicando duas cópias da região investigada. Em [B] núcleos interfásicos exibindo sinais fluorescentes verdes referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 21, indicando uma única cópia (monossomia) da região avaliada. Em [C] núcleo exibindo trissomia do cromossomo 15 e em [D] núcleos exibindo três sinais e um sinal fluorescente verde indicando trissomia e monossomia do cromossomo 15, respectivamente.....Pág 47

TABELAS

Tabela 1. Classificação FAB que compreende os cinco grupos da SMD..... Pág 11

Tabela 2. Fatores relacionados com a determinação do prognóstico para pacientes com a SMD de acordo com a classificação IPSSPág 26

Tabela 3. Principais grupos de risco para a determinação do prognóstico da SMD.....Pág 26

Tabela 4. Fatores prognósticos de acordo com a classificação WHO, considerando a presença de displasia e grupo de risco de acordo com classificação IPSS e número de linhagens hematopoiéticas com alterações displásicasPág 27

Tabela 5. Fatores prognósticos de acordo com a classificação WPSS - associação entre a classificação WHO, cariótipo e dependência transfusional.....Pág 27

Tabela 6. Comparação de classificação da OMS de 2008 e 2016.....Pág 28 e 29

Tabela 7. Dados descritivos por faixa etária, sexo, tratamento, exposição a agrotóxicos e aspectos gerais do cariótipo de indivíduos com diagnóstico de SMD.....Pág 42

Tabela 8. Informações obtidas do prontuário dos pacientes e nos relatórios médicos dos pacientes com SMD tais como sexo, porcentagem de blastos na medula óssea (MO), citopenias no sangue periférico (SP) e resultado do cariótipo e FISHPág 43

8.1 ANEXO I - Modelo de questionário aplicado aos pacientes com SMD.....Pág 56

8.2 ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....Pág 57

8.3 ANEXO III - Protocolo para execução de Cultura CelularPág 59

8.4 ANEXO IV - Protocolo para a execução de FISH (Hibridização fluorescente *in situ*.....Pág 61

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) compreendem morfologicamente distúrbios distintos caracterizados por hematopoiese displásica e ineficaz. A hematopoiese ineficaz deve-se, aparentemente, a um microambiente medular anormal que induz à morte precoce das células progenitoras hematopoiéticas (CPH) por apoptose. Além disso, 25% a 40% dos pacientes com SMD desenvolvem Leucemia Mielóide Aguda (LMA). O Diagnóstico da SMD é confirmado por testes laboratoriais que indicam uma redução nas principais células sanguíneas, uma abundância de células na medula óssea e morfologia celular anormal. Anormalidades cromossômicas nas células da medula óssea são encontrados em 40 a 60% dos pacientes com síndrome mielodisplásica, e para a elucidação do diagnóstico é utilizado o método de cariótipo, e posteriormente se necessário, pode ser usado FISH, CMA dentre outros. O objetivo desse trabalho é relatar o caso de 2 pacientes, um com trissomia em mosaico do cromossomo 17 e 21, e o outro com monossomia e trissomia do 15, relatando algumas técnicas utilizadas para diagnóstico da SMD, dando ênfase em ensaios cariotípicos e FISH. Os resultados encontrados foram 20% de trissomia do cromossomo 17, 26% de trissomia do cromossomo 21, 35% de monossomia e 1,5% de trissomia do cromossomo 15 confirmados por FISH. Os resultados encontrados estão em concordância com a literatura destacando a importância da detecção de alterações cromossômicas em malignidades hematológicas que fornecem informações essenciais para o diagnóstico e prognóstico para os médicos.

Palavras chaves - trissomias, FISH, CMA, *tp53*, doenças clonais

Myelodysplastic syndromes (MDS) morphologically comprise distinct disorders characterized by a dysplastic and ineffective hematopoiesis. The ineffective hematopoiesis is apparently due to an abnormal medullary microenvironment that induces early death of hematopoietic progenitor cells (MHC) by apoptosis. In addition, 25% to 40% of MDS patients develop Acute Myeloid Leukemia (AML). Diagnosis of MDS is confirmed by laboratory tests that indicate a reduction in major blood cells, an abundance of cells in the bone marrow and abnormal cell morphology. Chromosomal abnormalities in bone marrow cells are found in 40 to 60% of patients with myelodysplastic syndrome, and to elucidate the diagnosis, the karyotype method is used, and later, if necessary, FISH, CMA among others can be used. The objective of this study is to report the case of 2 patients, one with mosaic trisomy of chromosome 17 and 21, and the other with monosomy and trisomy 15, reporting some techniques used to diagnose MDS, with emphasis on karyotype and FISH. The results were 20% of trisomy of chromosome 17, 26% of trisomy of chromosome 21, 35% of monosomy and 1.5% of trisomy of the chromosome 15 confirmed by FISH. The results are in agreement with the literature highlighting the importance of the detection of chromosomal alterations in hematological malignancies that provide essential information for diagnosis and prognosis for physicians.

Keywords - trisomy, FISH, CMA, tp53, clonal diseases

1 INTRODUÇÃO

As síndromes mielodisplásicas são doenças clonais da célula estaminal hematopoiética de um grupo clonal heterogêneo caracterizada pela presença de medula hipercelular e displásica, com hematopóiese ativa, porém ineficaz que conduz à produção insuficiente de células sanguíneas periféricas (citopenias). Várias doenças do sangue são classificadas como eritrocitárias ou leucocitárias, e muitas vezes não está claro em qual categoria do SMD ela está inserida. Embora a SMD às vezes ocorra em adultos jovens e crianças, geralmente aparece em pacientes idosos (ADES *et al*, 2014).

A síndrome mielodisplásica (SMD) é uma doença hematológica cujo principal achado hematológico é a anemia, mas a SMD responde mal aos vários tipos de drogas usadas para tratar a anemia, e no passado foi chamado anemia refratária. Além disso, 25% a 40% dos pacientes com SMD desenvolvem Leucemia Mielóide Aguda (LMA), por isso a SMD também foi referida como pré-leucemia ou uma condição pré-leucêmica. A denominação equivocada de SMD é devido as características morfológicas de displasia, no sangue periférico e medula, embora na realidade se trate de uma doença neoplásica (CORTESÃO, 2010).

O Diagnóstico da SMD é confirmado por testes laboratoriais que indicam uma redução nas principais células sanguíneas, uma abundância de células na medula óssea e morfologia celular anormal. Nos casos primários não há histórico de doença subjacente ou administração de medicamentos tóxicos para a medula (YOSHIDA,1996).

A SMD é uma dentre várias patologias que necessita de mais estudos, pois aborda uma doença que afeta principalmente o idoso, com uma idade mediana no diagnóstico de 65-70 anos, cerca de 10% dos pacientes têm menos de 50 anos. A prevalência da SMD é predominantemente sexo masculino, no entanto os casos que apresentam a deleção 5q isolada, é predominante em mulheres. A incidência anual da SMD corresponde a quatro casos por 100 000 pessoas até os 70 anos (atingindo 40–50 por 100.000 após os 70 anos de idade) (UTSCH & BOECHAT, 2017; ADES *et al*, 2014).

As mielodisplasias secundárias são as que foram formadas devido a doença prévia com radioterapia e/ou quimioterapia e sua pior evolução é devido às alterações citogenéticas de prognóstico ruim (APA, 2006).

O cariótipo convencional é um método útil no diagnóstico de SMD, subclassificação para os subtipos definidos citogeneticamente e auxiliam na estratificação prognóstica. O Bandeamento G usando Tripsina e Giemsa (GTG) é o método de escolha mais comum, no entanto, a complementação metodológica com o teste de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) pode ampliar a capacidade de identificação de rearranjos cromossômicos especialmente nos casos em que o cariótipo convencional não é sucedido devido a falha de cultura ou em pacientes com SMD de risco intermediário a alto com cariótipo sem alteração (HELLSTROM-LINDBERG, 2005).

Esse estudo busca enfatizar a importância da metodologia de FISH na elucidação do diagnóstico da SMD, além de descrever alterações cromossômicas, por FISH, em um estudo de caso com 2 pacientes que tiveram alteração no cariótipo por bandeamento GTG.

2.1. HISTÓRICO

As síndromes mielodisplásicas compreendem morfologicamente distúrbios distintos caracterizados por hematopoiese displásica e ineficiente. (ROLLISSON *et al*, 2018). A medula anormal que induz a apoptose das Células Progenitoras Hematopoiéticas (CPH) são conhecidas por hematopoese ineficaz. A proliferação clonal se dá em decorrência das mutações somáticas que conferem vantagem proliferativa a estas células, apesar que a base molecular da transformação para a leucemia Mielóide aguda não esteja completamente compreendida (CHAUFFAILLE, 2006).

As SMDs são originais da medula, a partir de uma mutação somática das células progenitoras hematopoiéticas, o que leva a uma desordem nas vias de sinalização intracelular, que resulta em um aumento da apoptose nas células. Dessa forma, essa hemopatia encontra-se ineficiente, com displasia de uma ou mais linhagens celulares da medula óssea (MO), citopenias periféricas, aumento do número de mieloblastos no sangue periférico (SP) e/ou na MO, instabilidade genética alterações displásicas no osso precursor da medula óssea e um risco de progressão para leucemia mieloide aguda (MORAES *et al*, 2008; HELLSTRÖM LINDBERG, 2005).

Embora historicamente a SMD não tenha sido definido como câncer, porém resulta da expansão clonal do sistema hematopoiético progenitor e progride para LMA em aproximadamente 25 a 40% dos pacientes (ROLLISSON *et al*, 2018).

A classificação e o reconhecimento das SMDs evoluíram ao longo dos anos à medida que conhecimentos adicionais sobre esta patologia foi aumentando. A primeira vez que a SMD foi caracterizada foi por Leube em (1900), com a denominação de *leukanamie*, que seria uma anemia macrocítica em progresso para leucemia aguda, que não havia resposta ao tratamento convencional e cuja etiologia se pensava ser infecciosa. Posteriormente, foram descritos grupos de doentes com leucemia mielóide aguda seguida por anemia macrocítica, com as mesmas características clínicas da SMD (HELLSTROM-LINDBERG, 2008).

Chevallier e colaboradores apresentaram formalmente em 1942, as odontoleucemias, doenças com alto risco de progressão para leucemia. Eles

propuseram a terminologia *leucoses* para indicar as leucemias, embora sem sucesso. Em 1949, Hamilton-Paterson utilizou o termo anemia pré-leucêmica para descrever doentes com leucemia mielóide aguda sucedida por anemia refratária (CORTESÃO, 2010).

Em 1953, Block e colaboradores ampliaram o conceito de modo a abranger neste tipo de instituição nosológica as citopenias, atingindo todas as suas linhagens celulares. Foi relatado 12 casos de doentes com falência medular e que desenvolveram LMA após uma fase pré-leucêmica com 27 meses de duração. Posteriormente, este fato levou a uma nova denominação de pré-leucemia, que se manteve até a década de 70, aonde em seguida foi constatado que muitos destes doentes nunca progrediram para LMA, mas faleciam devido às complicações infecciosas secundárias. Então a terminologia pré-leucemia entrou em desuso e o termo síndrome mielodisplásica tornou-se mais adequado (NIMER, 2008).

O diagnóstico da SMD é variável, se tratando do conjunto de alterações citogenéticas, genéticas e epigenéticas relacionadas a esta patologia. Porém a evolução da SMD, e sua frequente progressão para leucemia mieloide aguda, ocorre em várias fases e enquadra mecanismos múltiplos e fatores hereditários e ambientais, que atingem a célula estaminal hematopoiética, que levam à alteração da função celular, e à emergência e conseqüentemente evolução de um clone pré-maligno (PFEILSTOCKER, 2007).

2.2 SINDROME MIELODISPLASICA

2.2.1 Aspectos gerais

Na SMD existe o número de células sanguíneas de cada linhagem ao longo do caminho de célula-tronco hematopoiética para células sanguíneas maduras, mas as células não amadurecem completamente e se diferenciam. Por causa dessa deficiência no processo de diferenciação, as células morrem na medula sem amadurecer e diferenciar completamente, caracterizando uma hematopóiese ineficaz (YTARO-YOSHIDA, 1996).

As síndromes mielodisplásicas são neoplasias hematopoiéticas clonais que comprometem uma grande subgrupo das neoplasias mieloides e coletivamente são os síndromes de falência de medula óssea adultas adquiridas mais comuns. Eles são caracterizados pela baixa sobrevida global devido a hematopoese ineficaz, citopenias progressivas e transformando em leucemia mieloide aguda (DEZERN, 2015).

Aproximadamente um terço dos pacientes com SMD progride para LMA. O risco de transformação difere entre os subtipos de SMD, e é significativamente maior na SMD com um aumento de blastos na medula óssea e naqueles com escores de maior risco de acordo com o IPSS. O processo de transformação pode ser considerado resultado do acúmulo de séries de doenças genéticas e eventos epigenéticos, como será descrito abaixo. A aquisição de anormalidades cromossômicas adicionais durante o curso da doença pode prever a evolução para uma forma mais agressiva de SMD ou LMA (HELLSTRÖM-LINDBERG, 2005).

2.2.2. Diagnóstico Clínico e Laboratorial da SMD

Demonstrando um espectro variado de aspectos biológicos, genéticos, características morfológicas e clínicas, as funcionalidades clínicas das SMDs têm uma história natural que varia de doença indolente que dura por anos para acelerar a progressão para leucemia mieloide aguda dentro de meses. As características clínicas das SMDs geralmente manifestações de insuficiência da medula óssea e consequente citopenias (anemia, neutropenia, trombocitopenia). Apesar sintomas comuns de apresentação incluem fadiga, palidez, infecção, hematomas e/ou sangramento. Os pacientes com mielodisplasia podem ser assintomáticos no momento do diagnóstico (NISHINO & SHANG, 2005).

O diagnóstico morfológico de SMD é baseado na citologia do sangue periférico e esfregaços de medula óssea e medula óssea histopatológica. A síndrome mielodisplásica é classificada em grande parte com base na morfologia celular, ou seja, a porcentagem de mieloblastos na medula óssea e no sangue, o tipo e o grau de displasia e presença de sideroblastos em anel (HELLSTROM-LINDBERG *et al*, 2005)

A triagem para a SMD deve começar com o fato de que há uma citopenia crônica e progressiva, apresentando medula com atividade normal ou hiperplásica, não sendo necessário que haja doença subjacente, tais como, a coagulação intravascular disseminada, hipertensão portal, doença do colágeno, etc, (NIMER, 2008).

A SMD é mais facilmente observada em pacientes de meia-idade e em idosos, mas pode ocorrer em pacientes jovens. A idade não é fator determinante na SMD. Para o seu diagnóstico é essencial o exame do aspirado da medula óssea, biópsia, avaliação citogenética e análise do sangue periférico, os quais podem revelar as características morfológicas da doença, além de excluir outras situações que cursam com citopenias (NIMER, 2008).

Nas SMDs, vários fatores clínicos e laboratoriais são avaliados como fatores prognósticos, os principais são: idade, mielodisplasia primária *versus* secundária, número de blastos medulares, número de citopenias periféricas, número de linhagens hematopoiéticas displásicas, alterações citogenéticas, entre outros (APA,2006).

Existem algumas anormalidades morfológicas típicas na SMD que incluem: megaloblastos, maturação dissociada do núcleo e citoplasma, eritroblastos anormalmente multinucleados com três ou mais núcleos, e sideroblastos em anel na linhagem eritrocitária; hipersegmentados ou neutrófilos hipossegmentados (anomalia nuclear pseudo-Pelger-Huët), grânulos reduzidos ou ausentes e peroxidase de neutrófilos negativos na linhagem granulocítica; e micromegacariócitos, megacariócitos com múltiplos núcleos isolados em forma de disco e plaquetas gigantes na linhagem megacariocítica, conforme apresentado na Figura 1.

Entretanto, essas anormalidades morfológicas não são específicas para SMD, e elas também são vistas em anemia perniciosa e leucemia mielocítica aguda. Portanto, um diagnóstico de SMD deve excluir essas outras doenças.

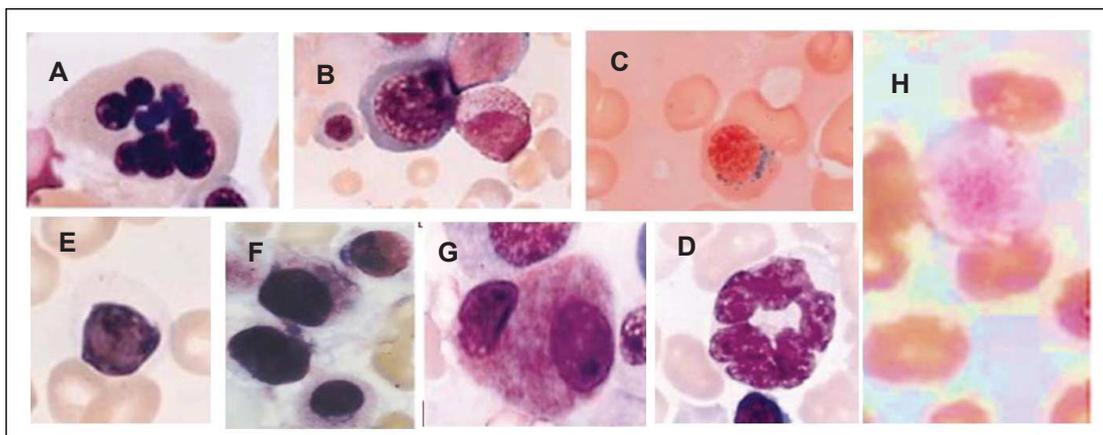


Figura 1. Células com anormalidades morfológicas típicas da SMD. Em [A] megaloblastos e eritroblastos anormalmente multinucleados, Em [B] maturação dissociada do núcleo e citoplasma. Em [C] sideroblastos em anel, em [D] linhagem eritrocitária hipersegmentados neutrófilos hipossegmentados [D e E], grânulos reduzidos ou ausentes. Em [F] neutrófilos negativos na linha granulocitária e micromegacariócitos, em [G] megacariócitos com múltiplos núcleos em forma de disco e [H] plaquetas gigantes (YTARO-YOSHIDA, 1996).

Os médicos devem considerar iniciar a análise molecular ao diagnóstico em pacientes com SMD clara ou suspeita clínica de SMD, nos quais os resultados de morfologia e citogenética não são informativos (por exemplo, em casos sem aumento de blastos ou sideroblastos em anel e / ou com um cariótipo normal). Estas análises

moleculares também podem ser realizadas em pacientes com um diagnóstico confirmado de SMD após falha terapêutica ou antes de um transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico, para melhorar a estratificação de risco e prognóstico (DEZERN, 2015).

2.2.3. Etiologia da SMD

Existem duas classificações em relação a SMD pode ser SMD primária ou *de novo* e secundária. A SMD primária não possui uma etiologia totalmente esclarecida, sabemos que pode resultar de infecções virais, exposição ao benzeno, exposição as radiações ionizantes e, mais raramente, congênitas. Determinados trabalhos trazem mutações em genes que participam da via de sinalização celular e defeitos nos mecanismos de reparo de DNA como fatores de risco para a progressão da SMD *de novo* (MORAES *et al*, 2008).

A SMD secundária ou de tratamento (SMD-t) é resultado do tratamento quimioterápico, especialmente com agentes alquilantes, ou radioterápico, e apresenta uma evolução clínica mais agressiva que a SMD primária. O tempo de latência é de geralmente quatro a sete anos após a exposição inicial ao agente e corresponde cerca de 10% do total de casos de SMD (MORAES *et al*, 2008).

Os agentes alquilantes podem causar deleções, monossomias ou perda dos cromossômicos, que podem resultar na maior viabilidade à quebra centromérica, após exposição do cromossomo. As alterações cromossômicas mais frequentes incluem deleções em 7q ou monossomia do cromossomo 7, sem alterações do cromossomo 5, resultando em mutações do gene *RAS* e metilação do promotor do gene *p15*. Além destes citados, outros casos de SMD em doenças antecipadamente tratados para outras patologias de linhagem mielóide, como a leucemia promielocítica, devido a sua taxa de sobrevivência elevada. Mas a existência de patologias como Anemia de Falconi e a Anemia Aplástica, podem aumentar a predisposição a ocorrer as SMDs (STROM, 2008).

As principais diferenças entre SMD relacionada com o tratamento e a SMD *de novo* incluem fatores como idade onde quanto mais jovem, maior incidência de evolução para leucemia, citopenias mais graves, displasia e diminuição da celularidade medular com fibrose, elevada incidência de anomalias clonais citogenéticas e

resistência à terapêutica. Estes casos tendem a apresentar um pior prognóstico (BACHER, 2007).

As SMDs são um grupo heterogêneo de desordens de células hematopoiéticas, caracterizado por ineficiência da hematopoiese, ocasionando citopenias de sangue periférico e um aumento do risco de progressão para LMA. Tanto o prognóstico quanto o curso clínico da SMD são altamente variáveis, e vários sistemas de pontuação tem sido desenvolvido para avaliar o prognóstico (SÁNCHEZ-CASTRO et al 2015).

O curso da doença é crônico, e em alguns casos evolui para leucemia aguda ou o paciente vai à óbito por infecção ou hemorragia. Em geral, as células do sangue surgem das células estaminais hematopoiéticas pluripotentes na medula. Na SMD, as células-tronco hematopoiéticas possuem mutações e não podem produzir um número suficiente de células sanguíneas maduras (YTARO-YOSHIDA,1996).

O curso clínico da SMD pode variar de doença estável a progressão rápida em leucemia. A remissão espontânea da SMD tem sido raramente observada. Este fenômeno é extremamente heterogêneo, talvez relacionado a diferentes formas de patogênese da doença (ORNELAS *et al*, 2009).

A leucemia mielóide aguda ocorre com mais frequência em crianças com Síndrome de Down, é precedida por uma fase pré-leucêmica mielodisplasia (SMD) caracterizada por trombocitopenia, a presença de um grande número de megacariócitos displásicos na medula óssea e menos de 30% de blastos no osso (ZIPURSKY *et al*,1994).

Em 1982, o Grupo Cooperativo Franco-Americano- Britânico (FAB) fundamentado em morfologias características, sugeriram uma classificação inicial para a SMD contendo 5 grupos, apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação FAB que compreende os cinco grupos da SMD.

Subtipo FAB	Blatos SP	Blastos MO	Sideroblastos em anel (MO)	Monócitos/mm³ (SP)
Anemia refratária (AR)	<1%	<5%	<15%	
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	<1%	<5%	>15%	
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	<5%	5-20%		
Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t)	>5%	21-30%		

Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	<5%	1-20%	>1000/mm ³
---	-----	-------	-----------------------

Bennett e col. (1982)

A detecção de anormalidades citogenéticas é essencial para a avaliação prognóstica de pacientes com SMD(Sánchez-Castro *et al* 2015). O significado prognóstico de algumas mutações nas síndromes mielodisplásicas tem sido descrito, mas estudos anteriores geralmente examinaram conjuntos de amostras retrospectivas, resultam que análises limitadas ou um pequeno número de genes, ou se concentraram exclusivamente em um subtipo particular de síndrome mielodisplasia(BEJAR *et al* 2011).

Anormalidades cromossômicas nas células da medula óssea são encontradas em 40 a 60% dos pacientes com síndrome mielodisplásica, enquanto pela citogenética convencional alterações no cromossomo 17 estão presentes em 2% dos pacientes. As anomalias mais comuns detectadas por citogenética convencional são del 5q, monossomia 7, del (7q), ganho de cromossomo 8, del (11q), del (12p), isocromossomo 17q i (17q) e del (20q) (BENNETT *et al*, 1982).

Dentro da SMD mutações nos genes *TP53*, *NRAS*, *RUNX1*, *TET2* e *IDH1* e *IDH2* foram relatadas por influenciar a sobrevida global em análises univariadas. Apenas mutações no gene *TP53* foram claramente associada a maus marcadores prognósticos, como um cariótipo complexo ,com três ou mais anomalias cromossômicas(BEJAR *et al* 2011).

A análise cromossômica das células da medula óssea é eficaz como um teste laboratorial diário para verificar a clonalidade, mas falta um teste capaz de avaliar a sensibilidade. O método FISH é útil para determinar clonalidade ao nível das células sanguíneas individuais, mas não pode ser usado em pacientes sem anormalidades cromossômicas. (YOSHIDA,1996).

Clones instáveis com deficiências funcionais são produzidos por células estaminais anormais. Do ponto de vista de pesquisas cromossômicas, acredita-se que a SMD apresenta tipos e, uma acumulação de múltiplos e aleatórios danos celulares. SMD é um dos principais temas de estudo sobre o início da leucemia em humanos e quando combinamos o que se sabe sobre o SMD e a sua participação na evolução da leucemia, pode-se entender melhor o desenvolvimento de SMD do ponto de vista da apoptose, anormalidades genicas, anormalidades cromossômicas e progressão clonagem (YOSHIDA, 1996).

Muitos fatores de risco para SMD foram propostos e o mais aceito internacionalmente destaca os quatro principais fatores de riscos: o índice de células blásticas na medula óssea, idade, anormalidades cromossômicas e trombocitopenia (YTARO-YOSHIDA,1996).

A Tabela 2 indica a pontuação para se determinar o prognóstico de pacientes com SMD, com cariótipo de baixo risco(bom prognóstico) contendo algumas alterações como deleções do cromossomo 5, 20 e Y. cariótipo com risco intermediário contendo as outras alterações citogenéticas , e cariótipo de risco elevado(prognóstico ruim) com alterações complicadas (>3) ou que envolvem o cromossomo 7 .enquanto que a Tabela 3 indica os principais grupos de risco por pontuação na classificação IPSS. A Tabela 4 indica os fatores prognósticos de acordo com a classificação O.

Tabela 2. Fatores Relacionados com a Determinação do Prognóstico para Pacientes com a SMD de acordo com a Classificação IPSS.

Pontuação	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Blastos M.O.	< 5	5 a 10	-	11 a 20	21 a 30
Cariótipo ¹	bom	intermediário	ruim		
Citopenias ²	0 a 1	2 a 3			

Tabela 3. Principais Grupos de Risco para a Determinação do Prognóstico da SMD

Grupo de Risco	Pontuação
Baixo	0
Intermediário 1	0,5 a 1
Intermediário 2	1,5 a 2
Alto	>2,5

de acordo com a soma de pontos na classificação IPSS

Tabela 4. Fatores Prognósticos de acordo com a classificação WHO, considerando a presença de displasia e grupo de risco de acordo com classificação no IPSS e número

Sistema	Prognóstico	Sobrevida média (meses)	
Linhagem (RA;RARS) IPSS	displasia unilineal	36.3	p = 0.01
	displasia multilineal	14.9	
	baixo	39.1	
	Intermediário 1	25.2	
	Intermediário 2	8.3	
Linhagem + IPSS	unilineal + baixo	42.5	p < 0.05
	multilineal + baixo	11.1	
	Unilineal +		
	Intermediário – 1	29.6	
	Multilineal + Intermediário – 1	10.1	

de linhagens Hematopoiéticas com alterações displásicas.

(APA *et al*, 2006)

O Sistema de Prognóstico mais relevante e atual foi o proposto por Malcovati no ASH 2005 (WPSS), aonde atuam os grupos com riscos citogenéticos que apresentam ou não de dependência transfusional. Deste modo conseguem-se determinar cinco categorias de risco com diferenças estaticamente significativas em termos de sobrevivência e risco de evolução para leucemia: [1] grupo de muito baixo risco (0 pontos); [2] grupo de baixo risco (1 ponto); [3] grupo de risco intermediário (2 pontos); [4] grupo de alto risco (3 -4 pontos); [5] grupo de muito alto risco (5-6 pontos), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Fatores prognósticos de acordo com a classificação WPSS- associação entre a classificação WHO, cariótipo e dependência transfusional

Variável				
Prognóstica	Valor 0	Valor 1	Valor 2	Valor 3
Categoria	RA,RARS,	RCMD e	RAEB-1	RAEB-2

WHO	5q-	RCMD- RS	
Cariótipo	favorável	intermediário	desfavorável
Dependência Transfusional	não	sim	

(APA *et al*, 2006)

Em 2001, a OMS propôs uma classificação alternativa para o SMD que foi modificado das definições originais franco-americanas-britânicas (FAB). Após essa modificação a classificação da OMS foi atualizada mais duas vezes, nos anos de 2008 e 2016 (Tabela 6). Segundo a última atualização de classificação da OMS identifica-se 6 tipos de SMD: [1]SMD com displasia de linhagem única (SMD-SLD);[2] SMD com sideroblastos em anel (SMD-RS);[3] SMD com displasia de multilinhagem;[4] SMD com excesso de blastos (SMD-EB);[5] SMD com del (5q) isolado;[6] e SMD inclassificável (SMD-U). Existe também uma classe adicional, porém provisória denominada “citopenia refratária da infância”. O SMD-SLD inclui anemia refratária (displasia eritróide de linhagem única), neutropenia refratária (disgranulopoiese de linhagem única) e trombocitopenia refratária (dismegacariocitopoiese de linhagem única). Os dois últimos foram anteriormente classificados como SMD-U em 2001, mas foram reclassificados na atualização de 2008.

Segundo os critérios de classificação da OMS de 2016 (Tabela 6), um dos meios de detecção dos subtipos de SMD é a partir dos resultados da avaliação celular do sangue periférico e medula óssea. A classificação de 2016 da SMD foi obtida a partir de parâmetros diferentes dos usados pelo sistema FAB e definidos pelos critérios que incluem: (A) alterações displásicas (B) número de citopenia em sangue periférico (C) porcentagem de anéis sideroblásticos (HAMID *et al* 2016).

Tabela 6. Comparação de classificação da OMS de 2008 e 2016

Classificação da OMS de 2008	Classificação da OMS de 2016
Citopenia refratária com displasia de unilinhagem (RCUD) anemia refratária abrangente (AR), refratária neutropenia (RN) e trombocitopenia refratária (RT)	SMD com displasia de linhagem única (MDS-SLD)

Anemia refratária com sideroblastos em anel (RARS)	Anemia refratária com sideroblastos em anel (RARS) SMS com sideroblastos em anel (SMD-RS)
	SMD-RS com displasia de linhagem única (SMD-RS-SLD)
	SMD-RS com displasia de multilinhagem (SMD-RS-MLD)
Síndrome mielodisplásica associada ao del isolado (5q)	SMD com del isolado (5q)
	SMD com excesso de blastos (SMD-EB)
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (RAEB-1)	SMD-EB-1
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (RAEB-2)	SMD-EB-2
Síndrome mielodisplásica não classificada (MDS-U)	SMD, inclassificável (SMD U)
	Com 1% de blastos sanguíneos
	Com displasia de linhagem única e pancitopenia
	Baseado na definição de anormalidade citogenética
Citopenia refratária da infância (Hamid et al 2016)	Citopenia refratária da infância

2.2.6. Alterações Cromossômicas na SMD

As malignidades mieloides são doenças que progridem ao longo do tempo, e geralmente exibem anormalidades múltiplas, incluindo CNV (variação do número de cópias), CN-LOH (perda de heterozigotidade por cópia neutra) e outros rearranjos e mutações genéticas. A identificação dessas anormalidades genéticas é essencial no diagnóstico e prognóstico da SMD, métodos como cariótipo convencional, FISH e SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) microarray contribuíram para melhor detecção (SHEN et al, 2018).

A análise citogenética tem uma importância no prognóstico notável na SMD e constitui uma importante ferramenta complementar ao diagnóstico morfológico da SMD. Aberrações cromossômicas estão presentes em 30-50% da SMD primária e em 80% da SMD relacionado à terapia. Embora muitas aberrações encontradas na SMD também são observadas na leucemia mieloide aguda, as translocações balanceadas favoráveis vistas na LMA raramente são observadas na SMD. Além disso, algumas

deleções ou deleções parciais são mais especificamente associadas a SMD, por exemplo deleção 5q, monossomia 7, deleção 7q, trissomia 8, deleção 11q, deleção 12p e deleção 20q. Múltiplas aberrações complexas são também frequentes em SMD. (HELLSTROM-LINDBERG, 2005)

Mutações genéticas associadas ao prognóstico foram identificadas, em TP53 são encontradas em 5-10% dos pacientes com SMD, especialmente em pacientes com cariótipo complexo del (5q), ou anomalias no cromossoma 17. Além disso, a mutação TP53 é associada a pior prognóstico (REN, *et al* 2019).

O cariótipo de células da medula óssea é um dos mais relevantes marcadores para o prognóstico de SMD. Alterações numéricas como monossomia do 5 ou 7, trissomia do 8, ou deleção do cromossom Y, e alterações estruturais ou no número de cópias dos cromossomos 5,7,8, e 20 estão entre as alterações citogenéticas mais comumente observadas em SMD (LUKAKCOVA *et al* , 2014).

Bejar *et al* (2011) relataram algumas mutações pontuais somáticas em genes comuns em SMD, são estes : *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *GNAS*, *RUNX1*, *ASXL1*, *TET2*, *NRAS*, dentre estes, mutações em *ASXL1*, *EZH2*, *ETV6*, *TP53* e *RUNX1* estão relacionadas com mau prognóstico e baixa sobrevida dos pacientes com SMD.

Uma correlação tem sido relatada entre a exclusão 17p e uma forma típica de disgranulopoiese combinando pseudo - Hipolobulação de Huet com a presença de pequenos vacúolos em granulócitos em SMD e LMA. Além disso, pacientes com deleção 17p frequentemente mostram mutação em *TP53*, sugerindo que a SMD com deleção 17p constitui uma nova entidade molecular. SMD com mutação no gene *TP53* e a deleção 17p é frequentemente secundária à terapia prévia do câncer, exibe cariótipo complexo e mostra um prognóstico extremamente desfavorável (CORTESÃO,2010).

O gene *TP53* está localizado na citobanda 17p13.1 e encontra-se bastante envolvido nessa síndrome. É um gene supressor de tumor crítico com funções no controle do ciclo celular, na reparação do DNA e na apoptose, bloqueando a passagem da fase G1 para o início da fase S do ciclo celular ou ativando a apoptose em resposta a lesão do DNA. Na ausência da proteína *tp53* funcional as células continuam a proliferar, mesmo com alterações do DNA, levando à acumulação de anomalias cromossômicas adicionais (CORTESÃO, 2010).

O gene *TP53*, apresenta-se inativo em cerca de 5% a 10% das SMDs, as quais se exibem em fases clínicas avançadas e com resultados cariotípicos instáveis e/ou

complexos, apresentando que as mutações podem ter que as mutações podem ter função na evolução da SMD para leucemia (CHAUFFAILLE, 2006).

A trissomia do cromossomo 15 é incomum em células de medula óssea, e é mais comumente identificado em pacientes idosos. Está tipicamente presente numa baixa porcentagem de células, em metáfase ou interfase, mas pode estar presente em todas as células da metáfase, sem implicar qualquer processo ou resultado particular da doença. Nesses casos, a citologia da medula óssea poderia ser insuficientemente anormal para permitir um diagnóstico definitivo SMD na apresentação (CURTIS *et al*, 2008; MOREL *et al*, 2003)

SINCLAIR *et al*, 1998 propuseram que possa haver uma associação entre a perda do cromossomo Y e a trissomia do cromossomo 15 e que a trissomia do cromossomo 15, como a falta do Y, pode nem sempre ser um marcador de malignidade, mas pode refletir um efeito de idade subjacente. A possibilidade de que sua presença possa anunciar o desenvolvimento de uma condição maligna não pode, no entanto, ser excluída.

O ganho de algumas trissomias autossômicas adquiridas é apoio ao diagnóstico e indicativo de prognóstico em pacientes com distúrbios hematológicos como trissomia dos cromossomos 4, 8, 9, 11 e 21 caracterizam subgrupos estabelecidos de pacientes leucemia mielocítica (LMA) e síndrome mielodisplásica (SMD) (BATANIAN, *et al*, 2000).

A trissomia adquirida do cromossomo 21 é a segunda mais comum trissomia em SMD e LMA após a trissomia do 8, os impactos clínicos e prognósticos destas anomalias em leucemias mieloide permanecem incompletamente caracterizadas. observações clínicas mostraram que há um aumento de 10 a 20 vezes risco de leucemia em indivíduos com trissomia constitucional 21, essa alteração leva a um mal prognóstico da SMD (SAVLI, *et al*, 2012).

2.3. TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA

A Citogenética é uma ciência relativamente moderna, que se iniciou com o desenvolvimento de métodos de coloração e bandeamento que possibilitou a visualização e a diferenciação dos cromossomos (SILVA, 2012). O marco inicial da citogenética humana é ligado aos estudos direcionados por Walther Flemming, desde

sua primeira publicação que continha suas ilustrações iniciais dos cromossomos humanos em 1882 (CUNHA, 2015).

A palavra “*cromossoma*” é de origem grega, resultando da junção das palavras “*khroma*”, que significa cor e “*soma*”, que significa corpo. Os cromossomos são descritos assim devido as primeiras experiências realizadas em laboratórios, aonde os cientistas puderam verificar que os mesmos eram facilmente corados para melhor visualização (CANDEIAS,2012). Os primeiros conceitos sobre cromossomos surgiu no final do século XIX, aonde foram realizados os primeiros estudos mitóticos. Um dos primeiros cientistas que descreveu o processo da divisão celular mitótica de forma clara foi o zoólogo alemão Anton Schneider, em 1873 (MASCENA, 2009).

Com o aumento das resoluções de lentes ópticas, no final do século XIX, a citogenética adquire um impulso tecnológico que confirma a identificação e determinação exata do número de cromossomos humanos, e inclui a análise do dimorfismo próprio dos cromossomos sexuais (CUNHA, 2015). Foi então definido por Joe H. Tjio e A. Levan o cariótipo humano como diploide ($2n=46$) com a notação cariotípica de 46, XY para sexo masculino e 46, XX para sexo feminino (JACOBS, 2014).

No início da década de 70 aconteceu um grande crescimento das técnicas de bandeamento cromossômicos que facilitaram a identificação de diversas anormalidades cromossômicas. Esse método colaborou para identificar mais precisamente cada cromossomo humano e, posteriormente, a detectar as aneuploidias e uma variedade de rearranjos estruturais, que inclui translocações, deleções e duplicações cromossômicas (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

Existem dois períodos que se divide a história da citogenética: [1] *Citogenética Clássica* que ressalta a idéia de que os fatores responsáveis pela transmissão de características estavam localizados nos cromossomos (MASCENA, 2009), e o segundo período; coma aquisição de metodologias moleculares e técnicas da *Citogenética Molecular*, dentre as quais as que se destacam são: Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), técnicas de bandeamento com fluoróforos ou grupos de corantes específicos que possibilitam a visualização de grupos de coloração diferenciada (CHAVES & NICOLAU, 2013)

Nos últimos anos, a Genética, principalmente a Genética Médica tem crescido no Brasil, obtendo muitos profissionais para a área. A Citogenética humana foi uma das pioneiras a ser implantadas no país, introduzindo em laboratórios de pesquisas em

seguida em laboratórios de análises clínicas. Atualmente, sua utilização adicionam a caracterização de polimorfismos e análise de agentes mutagênicos ou carcinogênicos. É uma ferramenta relevante de diagnóstico pré e pós-natal de anomalias congênitas, e neoplasias, sobretudo em hematológicas (KURTS et al, 2015)

Recentemente, a Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA), Amplificação Multiplex e Hibridização de Sondas (MAPH, do inglês, Multiplex Amplification and Probe Hybridization) e a Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação (MLPA, do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) destacou-se como as técnicas mais modernas da citogenômica (CUNHA, 2015). A CMA é uma tecnologia inovadora de estratégia útil com uma ferramenta adicional para as análises genéticas. Esse método tem sido recomendado como teste de diagnóstico de primeira hipótese para pacientes com atraso global de desenvolvimento, deficiência intelectual, transtornos do espectro do autismo e anomalias congênitas múltiplas (PEREIRA *et al*, 2014).

2.3.1. Estudo do Cariótipo

A análise citogenética é segundo MASCENA (2009) efetuada através do conhecimento do cariótipo que caracteriza a descrição de um grupo de cromossomos, que inclui a contagem do número total e as características morfológicas distintivas dos mesmos.

Segundo SHAFFER & TOMMERUP (2005), foi proposto um sistema de nomenclatura para os cromossomos em 1959 que seria para uso internacionalmente e que continua em vigor atualmente, sendo conhecido como Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenética Humana revisado (do inglês, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*).

Os cromossomos humanos foram organizados em 23 pares, 46 cromossomos no total, como mostra a Figura 2 (JACKSON, 2002). A enumeração é de 1 a 22 em ordem decrescente nos autossomos, e os cromossomos sexuais são designados X e Y. Os cromossomos são agrupados em 7 grupos de A a G, conforme apresentados na Figura 2 (SHAFFER & TOMMERUP, 2005; CHAVES & NICOLAU, 2013). A Figura 2 indica a imagem do cariótipo que estabeleceu o número de cromossomos da espécie humana.

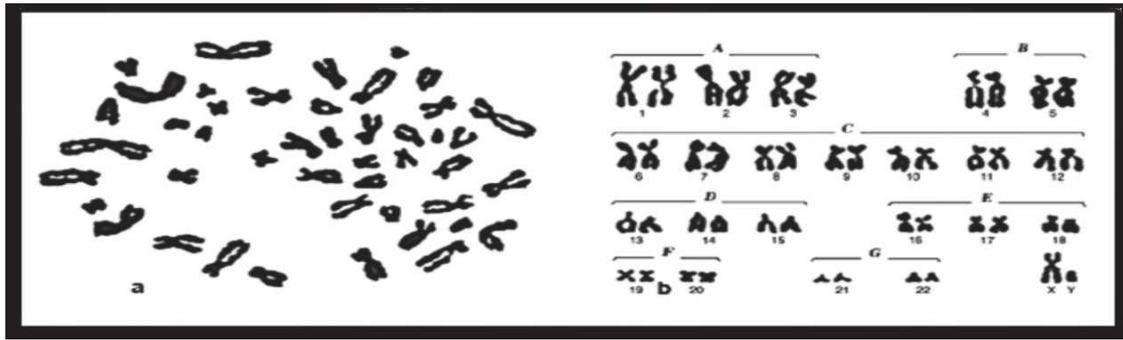


Figura 2 Imagem que permitiu a determinação de 46 como o número de cromossomos da espécie humana. Em [A] Metáfase e em [B] Pareamento cromossômico após a fixação e coloração com corante Giemsa (CANDEIAS, 2012, adaptada).

Foi estabelecido como gradativo o cariótipo, compreendendo cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos e um sistema simples do tipo X/Y para a designação sexual (CUNHA, 2015).

No estudo do cariótipo, a organização dos cromossomos acordo com o tamanho e propriedades morfológicas observadas durante a divisão celular, na fase de metáfase, quando os cromossomos se encontram num estado de máxima compactação (SILVA, 2012).

Dentro do cariótipo é usada a colchicina, que serve como um bloqueador da formação do fuso, e em seguida as células são submetidas ao choque hipotônico, para fixar e corar as lâminas (TICIANELLI et al., 2011). A partir do aperfeiçoamento das técnicas para o estudo dos cromossomos, tiveram sugestões de diversas metodologias de bandeamento cromossômico. Dentre elas, sobressai o bandeamento GTG, que utiliza tripsina e Giemsa para revelar bandas escuras e claras nos cromossomos humanos, denominadas de bandas G.

O bandeamento GTG foi um ganho para a citogenética pois possibilitou pesquisar as alterações estruturais e os cromossomos de uma metáfase e, amplificou a resolutividade dos diagnósticos citogenéticos humanos (JACOBS, 2014; CUNHA, 2015). A partir do bandeamento GTG, outras técnicas de bandeamento foram otimizadas, como o bandeamento G reverso, a coloração da heterocromatina constitutiva e a coloração das regiões organizadoras do nucléolo pela impregnação da prata, sendo que cada metodologia exhibe características e aplicações específicas, (CANDEIAS, 2012).

Todo cromossomo exibe várias regiões, bandas escuras e claras e o reflexo visível de unidades funcionais em nível molecular (SILVA, 2012). Devido a utilização dessas técnicas fez-se possível a identificação de todos os cromossomos, até mesmo dos cromossomos com alterações em números e na sua morfologia, resultando os primeiros trabalhos nesta área (SOUTO, 2012).

A análise cromossômica é relativamente trabalhosa e possui limitações, que pode incluir padrão de resolução de bandas inconsistente, mas devido há avanços na cultura celular, bandeamento, coleta e análise dos materiais de realização do cariótipo proporcionaram grandes avanços no diagnóstico de alterações cromossômicas, porém ainda há certas dificuldades em visualizar alguns rearranjos devido às características de coloração de regiões específicas do genoma, (KURTS et al, 2015 ;SHAFFER & BEJJANI, 2004)

Porém é necessário a realização do cariótipo, ainda em pacientes com suspeita clínica de pequenas deleções. O cariótipo deve ser a primeira técnica utilizada como triagem para posteriormente ser aplicada outras técnicas citomoleculares, a possibilidade de obtenção de resultados do método em curto prazo, agiliza condutas terapêuticas. Portanto, é importante elucidar que mesmo que o cariótipo tenha um resultado sem alteração, permanece a possibilidade de não ter sido identificadas alterações, necessitando de análises complementares (KURTS et al, 2015; TOPAZIO, 2013; PEREIRA, 2009).

2.3.2. FISH - Hibridização Fluorescente *in situ*

Nos últimos anos a aplicação das técnicas moleculares nos estudos dos cromossomos aumentaram, permitiram um grande avanço no campo da citogenética clínica (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006). Com base da citogenética molecular, que apresenta a junção de abordagens citogenéticas com a biologia molecular, (JACKSON, 2002) desenvolveu-se a hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) que trouxe uma evolução significativa a resolução e aplicação da citogenética (SOUZA, 2003). A Figura 3 indica resultado do FISH conforme apontado pelas setas indicando o local de hibridização da sonda.

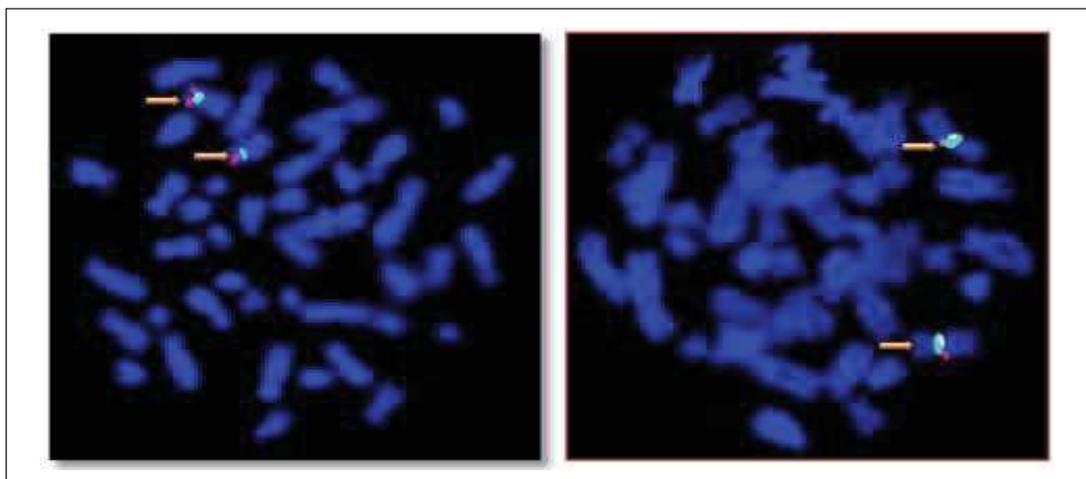


Figura 3. Resultado de FISH mostrando os sinais fluorescentes (indicados pelas setas) conforme a hibridização da sonda com a região alvo no cromossomo (CRUZ, 2015).

A técnica de FISH tem como fundamento a criação de sondas de oligonucleotídeos que complementam a região específica do DNA no paciente de interesse, consentindo a análise diferencial das estruturas que hibridizam com a sonda (MACHADO, 2006; ZHANG et al., 2010; NEVES; GUEDES, 2012).

A utilização dessa técnica compreende o mapeamento cromossômico, detecção citogenética de rearranjos e aneuploidias. Especialmente, as sondas para as aneuploidias mais comuns, incluem os cromossomos 13, 18, 21, X e Y, são usadas para rastrear rapidamente em eventos de gravidez de alto risco. Foram desenvolvidas algumas sondas específicas para sequências únicas, e locais específicos que são usadas para deleções específicas, microdeleções de locais variados, rearranjos de fusão de genes e as regiões teloméricas e centroméricas (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

Na SMD o cariótipo auxilia no diagnóstico, prognóstico, classificação, acompanhamento evolutivo, escolha da terapia e melhor elucidção da biologia da doença. Existem casos de SMD que não há detecção de alteração pelo estudo convencional por banda G, mas por meio da utilização de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) como uma ferramenta genética que auxilia e também fornece informações complementares, devido o FISH poder ser utilizado a células não divididas e amostras de tecido fixadas (CHAUFFAILLE, 2006)(CURTIS, et al 2008).

Existem desvantagens na utilização do FISH que entre elas está a não detecção de deleções e duplicações muito pequenas (inferior a 5Mb) e também por ser afetada pela qualidade do material cromossômicos. O FISH comparado com técnicas como CMA e MLPA é de rendimento inferior, porém de custo menor. Assim, demonstra

um método importante para a elucidação de casos clínicos das microdeleções mais comuns. Nos eventos de deleções atípicas pode ter resultado em falsos negativos, precisando da confirmação por técnicas mais abrangentes (TOPAZIO, 2013).

Para as análises são feitas geralmente um número de vinte metáfases, esse número garante que mosaicismos maiores que 14% sejam excluídos com nível de confiança de 95%. Para reduzir mosaicismos maiores que 10% com o mesmo nível de confiança é imprescindível a contagem de trinta células idênticas e, assim sucessivamente, quanto mais células, menor a chance de mosaicismo passar despercebido. Se no decorrer da análise de vinte metáfases encontrar uma célula anormal que pode representar um clone, é realizada uma contagem adicional, com cerca de cinquenta células (CHAUFFAILLE, 2006).

3.1. OBJETIVO GERAL

Relatar o caso de dois pacientes com diagnóstico clínico de Síndrome Mielodisplásica encaminhados à rede pública de saúde para avaliação cromossômica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apresentar as principais metodologias utilizadas o diagnóstico da SMD, incluindo a citogenética clássica e FISH.
- Utilizar a técnica de FISH para confirmar alterações cromossômicas em 2 pacientes que apresentaram resultados com alterações no cariótipo;

4.1. ESTRATÉGIA DE ESTUDO

Este estudo contribui para o desenvolvimento de uma proposta mais ampla, pertencente ao mesmo grupo de pesquisadores, denominada IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÕES GENÔMICAS RARAS EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E COM CARIÓTIPO SEM ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E/OU ESTRUTURAIS, cujo objetivo consistiu em utilizar testes genéticos para contribuir com o diagnóstico clínico da Síndrome Mielodisplásica, em nome de Cristiano Luiz Ribeiro doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade UnB/UFG/PUC Goiás (Rede Pró-Centro-Oeste).

As Atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular / Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (LaGene/LACEN/SES-GO) e no Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC Goiás) da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas em colaboração e com o Setor de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG).

17

Amostras de medula óssea de 17 pacientes foram coletadas junto ao setor de Hematologia do HC/UFG. Para cada paciente foram realizados os procedimentos de citogenética convencional pelo cariótipo GTG. Desses pacientes, em 08 (oito) não foram encontradas alterações cromossômicas e seguiram para a análise do CMA, enquanto que, em 06 (seis) pacientes foram encontradas alterações cromossômicas e 3(três) não tiveram qualidade para prosseguir com as metodologias. Os casos que seguiram para o CMA visaram a identificação de variações em regiões genômicas nos pacientes com indicação clínica de SMD e com cariótipo sem alterações numéricas e/ou estruturais. Apenas 02 (dois) pacientes dos casos em que foram identificados com alterações no cariótipo necessitaram a realização da técnica FISH para a confirmação dos resultados citogenéticos. O fluxograma a seguir destaca a sequência das atividades desse projeto e que se encontra na Figura 4.

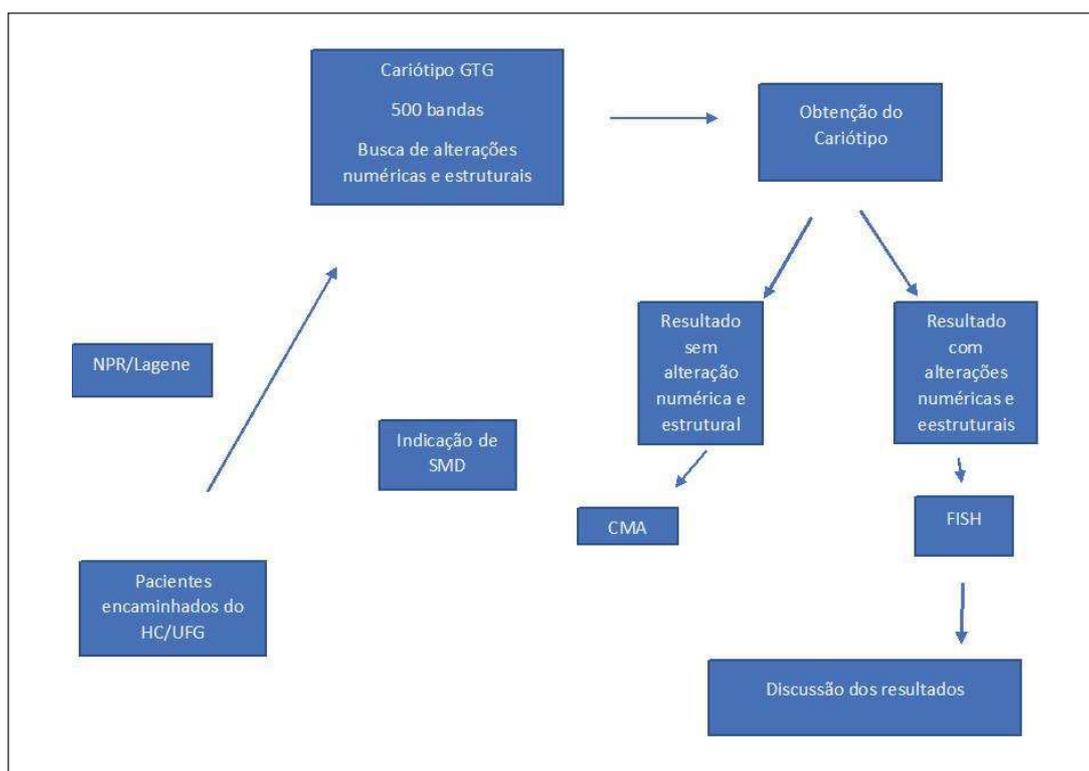


Figura 4. Fluxograma representando a sequência das atividades desenvolvidas na avaliação dos pacientes com SMD.

4.2. GRUPO AMOSTRAL

Foram avaliadas amostras de medula óssea de 17 pacientes de ambos sexos, com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica e idade variando entre 26 a 79 anos.

A participação no estudo e as doações das amostras biológicas foram voluntárias e seguiram todas as recomendações exigidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Todos os pacientes preencheram um questionário e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS com número do parecer **1.413.919** em 18/02/2016.

4.4. COLETA E REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

Um total de 4 mL de medula óssea foram obtidas pelo Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás utilizando seringas heparinizadas para realização dos testes genéticos. Para a realização do cariótipo foi usado 2mL de medula óssea. As amostras coletadas faziam parte da rotina diagnóstica dos pacientes, ou seja, não foram coletadas apenas para o desenvolvimento do estudo genético. O sangue foi acondicionado em tubos tipo eppendorf devidamente identificados. Posteriormente, as amostras de sangue periférico com EDTA foram armazenadas a -20°C para posterior isolamento e purificação do DNA para realização de testes adicionais.

4.5. FISH (Hibridização *in situ* por fluorescência)

As lâminas previamente preparadas durante a realização do cariótipo e que não foram utilizadas na análise citogenética clássica foram encaminhadas para a realização do FISH, conforme Anexo III. Dessa forma escolheu-se uma região na lâmina na qual se encontrava o material apropriado para a realização do teste. Preferencialmente, escolheu-se as regiões onde se encontravam vários núcleos interfásicos e/ou com metáfases bem espalhadas. A hibridização foi realizada em um hibridizador de lâminas (*Hybrite®*, Abbott Molecular, Estados Unidos da América) utilizando a sonda cromossômica VYSIS®. As imagens obtidas foram capturadas sob microscopia de epifluorescência com o auxílio de uma estação de cariotipagem contendo um microscópio *Axioplan 2 Imaging®* (Carl Zeiss, Alemanha), platina motorizada para escaneamento da lâmina e as imagens analisadas com auxílio do software ISIS® (Metasystems Corporation, EUA).

As sondas usadas foram:

- Chromosome 15, localizado em 15p11.1-q11.1, LPE 015(D15Z4), verde, sonda Cytocell/ UK
- Chromosome 21, localizado em 21q22.13-q22.2, LSI 21, laranja, abbot molecular/ EUA
- Chromosome 17, localizado em 17p13.1, LSI TP53, laranja, abbot molecular/ EUA

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados dos pacientes foram obtidos em prontuários médicos junto ao Setor de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) referentes às informações populacional e clínica tais como: sexo, idade, exposição ocupacional aos agrotóxicos, número de blastos na medula óssea, presença de citopenias no sangue periférico e os tratamentos em que os pacientes estavam sendo submetidos, encontram-se arquivados e fazem parte do acervo do laboratório do Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC Goiás) (Modelo do questionário - Anexo I).

Dados descritivos, como faixa etária, sexo, tratamento, exposição à agrotóxicos e cariótipo da coorte dos 17 pacientes com diagnóstico de SMD incluídos neste estudo, estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Dados descritivos por faixa etária, sexo, tratamento, exposição aos agrotóxicos e aspectos gerais do cariótipo de indivíduos com diagnóstico de SMD.

Variáveis	Número de pacientes	Frequência (%)
Faixa Etária (anos)		
≤ 60	5	29.4
> 60	12	70.6
Sexo		
Feminino	13	76.5
Masculino	4	23.5
Tratamento		
Não	10	58.8
Sim	7	41.2
Exposição a agrotóxicos		
Não	13	76.5
Sim	4	23.5
Cariótipo		
Alterado	6	35.3
Não alterado	8	47.1
Relatório	3	17.6

Foram analisadas, no mínimo, 20 metáfases por paciente, por meio do cariótipo GTG, das amostras de medula óssea dos 17 pacientes com SMD. Destes, [a] 06 (seis) pacientes apresentaram diversas alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais; [b] 03 (três) pacientes não apresentaram expansão clonal na cultura celular e foi emitido um relatório para o médico assistente, informando que não houve expansão clonal da medula óssea do paciente; [c] 08 (oito) pacientes apresentaram o cariótipo sem alterações numéricas e/ou estruturais, os quais suas amostras seguiram para a análise pelo CMA.

Nesse estudo, dos 06 (seis) resultados com alterações cromossômicas, apenas 02 (dois) pacientes necessitaram da confirmação dessas alterações utilizando a metodologia FISH. Adicionalmente, as informações como sexo, porcentagem de blastos na medula óssea, citopenias no sangue periférico, resultados do cariótipo e do FISH identificadas em 20/150 células analisadas em média, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Informações obtidas do prontuário dos pacientes e nos relatórios médicos dos pacientes com SMD tais como sexo, porcentagem de blastos na medula óssea (MO), citopenias no sangue periférico (SP) e resultados do cariótipo e FISH.

Pacientes	Sexo	Blastos na M.O. (%)	Citopenias (S.P) *	Resultado do Cariótipo / %	FISH / %
ONCO 006	F	5	Plaquetopenia Eritropenia	mos 47,XX+17[1]/47,XX,+21[2]/46,XX,[17]	Nuc ish (TP53x3)[20/100]/ 21q22(D21s65X3)[26/100]
ONCO 016	F	6	Leucopenia Eritropenia	46,XX[18]/47,XX,+15[2]	nuc ish 15p11(D15z4x3)[3/200]/ 15p11(D15Z4x1)[70/200]

Paciente *ONCO 006* com diagnóstico de SMD, sexo feminino, com 65 anos, sem tratamento prévio e sem histórico acidental e/ou ocupacional de exposição à

radiação ionizante e/ou aos agrotóxicos. A classificação prognóstica deste paciente foi de alto risco para o desenvolvimento da LMA. O tratamento médico inicial foi com azacitidina e corticóide. Após 12 meses do diagnóstico e tratamento, o paciente evoluiu para LMA.

Os resultados da hibridização cromossômica (FISH) para o paciente ONCO 006 estão apresentados na Figura 6. Destacam-se núcleos interfásicos e/ou metáfase exibindo sinais fluorescentes vermelhos em regiões específicas para os cromossomos 17 (região centromérica) e 21 (região 21q), demonstrando as trissomias observadas.

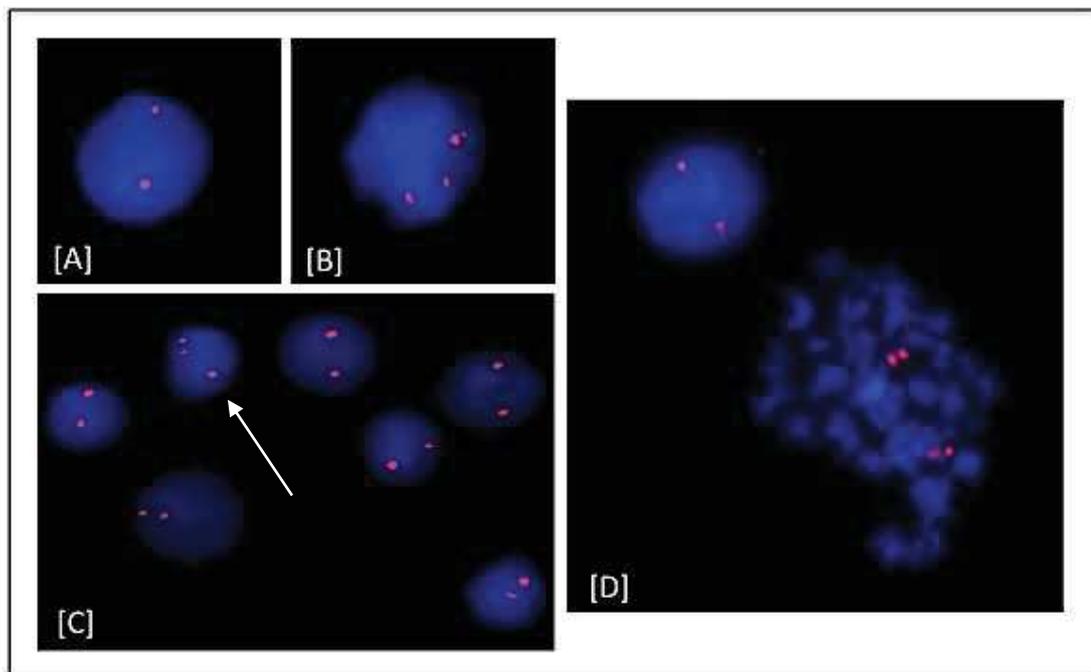


Figura 5. Hibridização Fluorescente “*in situ*” em células da medula óssea do paciente *ONCO 006*. Em [A] e em [B] núcleos interfásicos exibindo sinais fluorescentes vermelhos referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 17, indicando duas cópias e três cópias das regiões investigadas, respectivamente. Em [C] núcleos interfásicos exibindo sinais fluorescentes vermelhos referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 21, indicando duas cópias ou três cópias (seta) das regiões investigadas, respectivamente. Em [D] núcleo e metáfase exibindo duas cópias do cromossomo 21.

O resultado do cariótipo foi relacionado com informações clínicas, morfológicas e laboratoriais, possibilitando determinar a classificação prognóstica para os pacientes, baseado no *IPSS-R* (Greenberg, 2012). As trissomias envolvendo os cromossomos 17 e 21 são alterações já descritas na SMD e estão associadas a um alto

risco de evolução das mielodisplasias para LMA, sendo observadas em 20 a 40% dos casos descritos na literatura (ADÈS *et al*, 2014).

As alterações envolvendo o cromossomo 17, tem sido observadas principalmente em pacientes com risco intermediário ou alto risco de acordo com o IPSS em 79% dos casos e são associados com trombocitopenia e a menor sobrevivência. Além disso, pacientes com alteração no gene *TP53* mostraram escassez de mutações em outras regiões gênicas, sugerindo que esse grupo poderia ser considerado uma subclasse molecular distinta de síndromes mielodisplasias apresentando com um mecanismo patogênico único (GREENBERG *et al*, 2012).

Outros fatores podem desencadear a evolução da SMD, como visto por GFCH (1997) em um caso de trissomia do 21 que não foi o fenótipo da síndrome de Down que levou ao SMD, mas a instabilidade cromossômica espontânea, de origem desconhecida presente no paciente.

A trissomia clonal do cromossomo 21 é a segunda causa mais comum de trissomia presente em pacientes com SMD e LMA, após a trissomia do cromossomo 8. Os impactos clínicos e prognósticos destas anomalias em linhagens mielóides permanecem incompletamente caracterizadas. Porém, observações clínicas mostraram que há um aumento de 10 a 20 vezes do risco de leucemia em indivíduos com trissomia constitucional do cromossomo 21, essa alteração leva à determinação de um prognóstico ruim da SMD (SAVLI *et al*, 2012).

O presente estudo demonstrou que as alterações observadas na análise do cariótipo em pacientes com diagnóstico de SMD foram as mesmas observadas no FISH, se considerarmos o paciente *ONCO 006*, porém com diferentes porcentagens de células alteradas (Tabela 7). Este fato pode ser em resposta ao maior número de células analisadas quando comparamos a citogenética convencional com o FISH. Dessa forma, em condições laboratoriais de diagnóstico para SMD, a avaliação cariotípica deve ser realizada considerando um maior número de células possível, ou pelo menos 50 metáfases, afim de identificar com maior precisão a porcentagem de células clonais.

Segundo Dezern (2015), a citogenética tornou-se uma ferramenta diagnóstica importante sendo indispensável para a identificação de anomalias cromossômicas em várias situações que envolvem patologias hematológicas, perdendo seu aspecto investigativo, destacando porque admite um diagnóstico preciso, a estratificação prognóstica, a classificação, a orientação terapêutica, a observação do tratamento ou

acompanhamento evolutivo e o entendimento dos fenômenos fisiopatológicos subjacentes.

Mesmo que muitas alterações cromossômicas sejam elucidadas por cariótipo, alguns casos não demonstram todas as anormalidades, pode ser devido a célula clonal que não entrou em divisão, ou porque se trata de rearranjos de segmentos menores que 3 a 5 milhões de pares de base (Mb), não identificáveis pelo cariótipo. A Hibridização Fluorescente “*in situ*” é uma metodologia citogenética-molecular que sobressai ao cariótipo convencional, por permitir, com maior sensibilidade, a determinação de sequências específicas do DNA, seja em metáfases ou em núcleos interfásicos (DEZERN, 2015).

Segundo Ahmad & Iqbal (2012) o uso do cariótipo convencional somente, para a elucidação não é adequado para SMD, devido a possibilidade de algumas alterações cromossômicas passarem despercebidas, portanto, o teste de FISH tem sido muito usado para elucidar alterações cromossômicas em SMD, devido ao uso de sondas específicas.

A Figura 7 indica os resultados da hibridização cromossômica para o paciente ONCO 016. Apenas núcleos interfásicos foram analisados, os quais exibem sinais fluorescentes verdes para a região específica do cromossomo 15 (região centromérica).

Em relação ao paciente ONCO 016 os resultados obtidos no cariótipo diferem ainda mais dos resultados do FISH, quando comparados com os resultados do paciente ONCO 006.

A presença de três sinais fluorescentes verdes indica uma trissomia do cromossomo 15, e a presença de apenas um sinal indica monossomia. Estas duas situações foram diferentes em relação ao cariótipo, sendo a trissomia identificada por FISH em uma porcentagem de células clonais muito menor do que no cariótipo (Tabela 7). Esta condição pode ser compreendida por uma identificação rápida das células que não expressavam a trissomia do cromossomo 15 e que a análise foi realizada apenas em núcleos interfásicos.

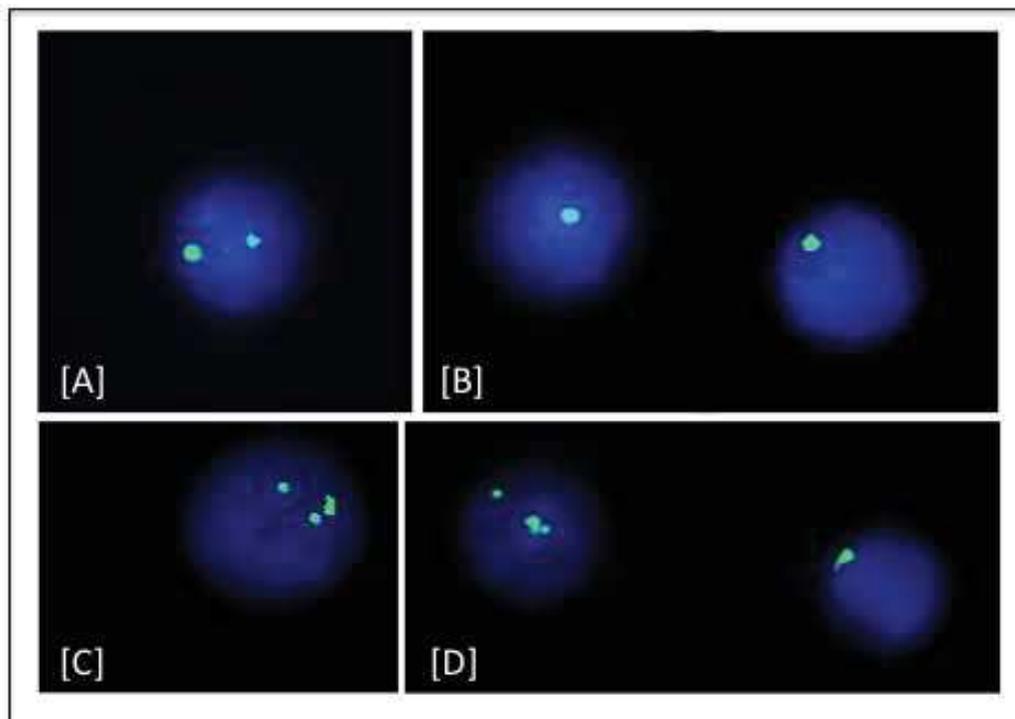


Figura 7. Hibridização Fluorescente “*in situ*” em células da medula óssea do paciente *ONCO 016*. Em [A] núcleo interfásico exibindo dois sinais fluorescentes verdes referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 15 (região centromérica), indicando duas cópias da região investigada. Em [B] núcleos interfásicos exibindo sinais fluorescentes verdes referentes a hibridização da sonda sítio específica para o cromossomo 15, indicando uma única cópia (monossomia) da região avaliada. Em [C] núcleo exibindo trissomia do cromossomo 15 e em [D] núcleos exibindo três sinais e um sinal fluorescente verde indicando trissomia e monossomia do cromossomo 15, respectivamente.

Por outro lado, a não identificação da monossomia do cromossomo 15 pelo cariótipo é uma condição que deve ser considerada relevante. Na citogenética convencional a qualidade dos preparados metafásicos é fator determinante para o prosseguimento da avaliação cromossômica. Quando os investigadores encontram metafases de baixa qualidade, é comum não utilizarem aquela imagem na investigação, e dessa forma, alterações importantes deixam de ser observadas. Esta subjetividade de análise influencia os resultados e comprometem o estabelecimento correto do prognóstico da doença.

Sanchez-Castro e colaboradores (2015) relataram em que dos 220 pacientes investigados, o cariótipo havia indicado células com monossomias do cromossomo 17 em 20% dos casos (20 metafases por paciente), sendo que por FISH apenas 02 pacientes (0,9%) exibiram monossomias do 17, evidenciando também, uma situação de diversidade entre os resultados da citogenética convencional e da molecular.

Curtis e colaboradores (2008) apresentaram alguns critérios de análises cromossômicas para situações de doenças hematológicas, ressaltando a necessidade de bons preparados cromossômicos para que a citogenética possa ser utilizada no diagnóstico destas patologias.

A trissomia do 15 foi identificada pelo cariótipo em 10% as células analisadas da paciente ONCO 016, porém nos resultados encontrados em FISH foram encontrados trissomia e monossomia em mosaico do 15, essa trissomia como única anomalia autossômica é rara nos distúrbios hematológicos e nestes casos, foi encontrada em síndromes mielodisplásicas (MOREL, *et al* 2003).

Bartanian e colaboradores (2000) relataram também estudos com resultados contendo poucas células trissômicas, um caso de 5/700 células analisadas (0,7%). Os resultados do nosso estudo mostraram que apenas 1,5% das células da medula óssea analisadas por FISH revelaram a trissomia do cromossomo 15.

Segundo Sinclair e colaboradores (1998), os pacientes que foram encaminhados para a realização de análise citogenética convencional que tiveram alterações cromossômicas, mas sem malignidade, não sofreram evolução para a LMA, dessa forma, o mais provável é que a citologia medular anormal não é o suficiente para um diagnóstico definitivo.

Segundo Schanz e colaboradores (2012) muitas das anormalidades cromossômicas observadas na SMD estão relacionadas com a evolução da doença para LMA. Quando comparamos estas evidências aos resultados encontrados nesse trabalho, os pacientes *ONCO 006* e *ONCO 016* evoluíram, posteriormente, para Leucemia Mielóide Aguda.

As síndromes mielodisplásicas possuem diversas alterações citogenéticas que podem ser identificadas por técnicas como FISH, CMA, MLPA dentre outras, pois possuem alterações menores que a capacidade de detecção do cariótipo, que tem uma resolução limitada. Dentre todas as metodologias citadas, o método FISH consegue superar as limitações impostas ao cariótipo, uma vez que possui maior resolução, permitindo análise de regiões específicas, porém apresenta também desvantagens, dentre as quais destacamos a de não analisar o genoma completo, o que pode ser investigado por CMA (LOPES, 2015).

A detecção de alterações cromossômicas em malignidades hematológicas fornecem informações essenciais para o diagnóstico e prognóstico para os médicos. No entanto, ainda os métodos convencionais de citogenética, como bandeamento G,

são os mais utilizados para identificar aberrações cromossômicas nas células tumorais (DEZERN, 2015).

Mesmo com muitos aspectos biológicos moleculares a serem esclarecidos para a compressão da biologia e fisiopatologia da SMD novas abordagens metodológicas (CMA, MLPA, dentre outras) devem ser implementadas, visando a identificação de estruturas genômicas que contenham genes com funções importantes na patogênese da SMD.

Os resultados previamente apresentados e discutidos permitem concluir que:

- A detecção de algumas alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica pode ser realizada por várias técnicas citogenéticas, onde destacamos o método de FiSH (Hibridização fluorescente "*in situ*").
- Os métodos de análise citogenética (convencional e molecular por FISH) para a SMD mostraram-se divergentes ;
- Os resultados dos pacientes *ONCO 006* e *ONCO 016* estão em consoância com a literatura, com destaque a importância da técnica de FISH para diagnóstico da síndrome mielodisplásica.
- Nas mielodisplasias, as alterações genéticas têm sido associadas às alterações oncogênicas e que metodologias citogenômicas devem ser implementadas para investigar manifestações genômicas que podem estar relacionadas a SMD e sua evolução para LMA.

- ADES, L *et al* , 2014, **Myelodysplastic syndromes**, *Lancet*, 383: 2239-52
- AHMAD, A & IQBAL, MA,2012, **Significance of genome-wide Analysis of Copy Number Alterations and UPD in Myelodysplastic Syndromes using Combined CGH- SNP Arrays**, *Current Medicinal Chemistry*, 2012,19,3739-3747
- ALBANO, L.M.J.2000, **Importância da genética no serviço público: relato da extinção de um setor de genética no município de São Paulo, Brasil**, *Rev Panam Salud Publica*. 2000; 7 (1), 29-34.
- APA, AG, et al , 2006, Fatores prognósticos nas síndromes mielodisplásicas, *Rev. Bras. Hemoter* 28(3):198-200
- BACHER, U *et al* 2007. **A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia**. *Haematologica*. 92(6): 744-52.
- BARTANIAN, 2000, **Trisomy 15 Is Frequently Observed a Minor Clone in Patients with Anemia/MDS/NHL and as a Major Clone in Patients with AML**, *Cancer Genet Cytogenet* 121:186-189
- BEJAR R, *et al* .2011 **Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes**. *N Engl J Med*. 364 (26): 2496-2506.
- BENNET *et al* 1982. **Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes**, *Br J Haematol*, jun;51(2):189-99
- CANDEIAS, C.I. F. Alterações dos Cromossomas Sexuais em Mulheres com Suspeita Clínica de Cromossomopatia. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Ciências Universidade do Porto. 2012.
- CHAUFFAILLE, M.L, 2006. **Alterações moleculares em síndrome mielodisplásica**, *Rev. bras. hematol. hemoter*;28(3):188-193
- CHAVES, T.F.; NICOLAU, L.S, 2013 **Citogenética e cariotipagem humana**. *Revista Saúde e Desenvolvimento*; v. 4, 20-25.
- CORDOBA, *et al*, 2012, **The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk**, *Leukemia Research*,36, 287-292
- CORTESÃO, N.B.R.E dissertação de mestrado em nutrição clínica, Nutrição e alterações epigenéticas na síndrome mielodisplásica, 2010

CUNHA, D. M. C. Análise cromossômica por microarranjos em probandos com indicação clínica de Síndrome de Down sem alterações cariotípicas. Dissertação de mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, 2015.

CURTIS *et al*, 2008, **A Clonal Chromosome Abnormality in Bone Marrow With Doubtful Hematologic Significance**, *Am J Clin Pathol* 129:478-485

ALBANO, L.M.J. **Importância da genética no serviço público: relato da extinção de um setor de genética no município de São Paulo, Brasil**. *Rev Panam Salud Publica*. 2000; 7 (1), 29-34.

DEZERN, A, E (2015) **Nine years without a new FDA-approved therapy for MDS: how can we break through the impasse?**, *MYELODYSPLASTIC SYNDROMES: EVOLVING DIAGNOSIS AND THERAPY*, ASH education book, december 5, no. 2 308- 316

DUTRA, R.L.; *et al* 2012 **Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries**. *BMC Research Notes*; vol. 5:13.

GRUPE FRANCAIS DE CYTOGÉNÉTIQUE HÉMATOLOGIQUE, **Forty-four cases of childhood myelodysplasia with cytogenetics**, documented by the Groupe Francais de Cytogénétique Hématologique, *Leukemia* (1997) 11, 1478–1485

GUITART-FELIUBADALÓ, M, *et al*, 2006. **Causas cromosômicas que originan el retraso mental: alteraciones cromossômicas diagnosticables en el paciente**. *Revista de Neurologia*; 41(Supl 1):S21-26.

HAMID, G.A, 2016. **Diagnosis and Classification of Myelodysplastic Syndrome**, *IntechOpen*, 82532

HARADA H. 2003. **Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia**. *blood*. 103(6) 2316-25

HELLSTROM-LINDBERG E. (2005) **Strategies for biology- and molecular-based treatment of myelodysplastic syndromes**. *Current Drug Targets*, 2005, 6, 713-725

HELLSTROM-LINDBERG, E. (2008) **Myelodysplastic Syndromes na Historical perspective**. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 42

JACKSON L, 2002, **Cytogenetics and molecular cytogenetics**. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2002; 45(3):622-639.

JACOBS, P.A. **An Opportune Life: 50 Years in Human Cytogenetics**. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2014; 15: 29-46.

KIM-HIEN T, 2017 Dao, **Myelodysplastic Syndromes: Updates and Nuances**, *Med Clin N Am* 101 (2017) 333–350, 2017

KURTS, G.C, *et al* 2015. **Software para Auxílio no Processo de Elaboração do Cariótipo**, *RITA* v22, n2

LOPES, Larissa Fonseca Borges, *Avaliação clínica das síndromes de microdeleção investigadas pela hibridização (Bahia, Brasil*, Monografia do curso de medicina da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015

LUKACKOVA, 2014, **Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review**, *Biomed Pap Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, sep; 158(3):339-345

MACHADO, S. P. A, 2006 Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água. 64 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia do Ambiente) — Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga.

MASCENA, J.R, 2009 Estudos citogenéticos realizados no Hospital Universitário da UFSC no período de 2003 a 2008. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina.

MENDES, A. K. S, 2012 O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) e o aCGH (array Comparative Genomic Hybridization) no diagnóstico de alterações cromossômicas. Dissertação de Mestrado, Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro – Vila Real.

MILLER, D.T.; *et al*, 2010, **Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies**. *American Journal of Medical Genetics*. 2010; 86:749-764.

MINASI, L. B.; *et al* , 2015, **Postnatal diagnosis of constitutive ring chromosome 13 using both conventional and molecular cytogenetic approaches**. *Genetics and molecular research: GMR*. 2015; v. 14, n. 1, p. 1692.

MOREL, F *et al*, 2003, **Trisomy 15 as the Sole Abnormality in Myelodysplastic Syndromes: Case Report and Review of the Literature**, *Leukemia and Lymphoma*, 2003 Vol. 44 (3), pp. 549–551

NEVES, S. M.N.; GUEDES, R.M.C. **Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária**. *Arquivo do Instituto de Biologia*, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-632, out-dez. 2012.

NIMER, S.D(2008) **Myelodysplastic syndromes clinicopathologic deatures, pathobiology, and molecular pathogenesis**. *Arch Pathol Lab Med*. 129(10)1299-310.

NISHINO & SHANG, (2005) **Myelodysplastic syndromes clinocopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis**, *Arch Pathol Lab Med*- Vol 129, October

ORNELAS, M.H, *et al*, 2009 **Transient myelodysplasia in an infant with Down syndrome preceding acute megakaryoblastic leukemia: cytogenetic and immunophenotypic findings**, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 188 (2009) 54 e 56

PEREIRA, R.R.; *et al*, 2014 **Screening for intellectual disability using high-resolution CMA technology in a retrospective cohort from Central Brazil**. *Plos One*. 2014; 9 (7).

PFELSTOCKER, M *et al*, 2007. **Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications**. *Leuk Lymphoma*. 48(10):1900-9.

PREBET *et al*,2011, **Outcome of High- Risk Myelodysplastic Syndrome After Azacitidine Treatment Failure**, *Journal of clinical oncology*,

PINTO, I.P. A importância dos resultados do CMA no aconselhamento genético das famílias com probandos apresentando deficiência intelectual. 10/02/2015. 64 p. Dissertação de Mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia 10/02/2015, Mestrado em Genética, 2015.

REN, Y,(2019) Analysis of clinical and molecular features of MDS patients with complex karyotype in China, *Blood Cells, Molecules and Diseases* 75(2019)13-19

SAVLI *et al*, 2012, **High Throughput FISH Analysis: A New, Sensitive Option For Evaluation of Hematological Malignancies**, *Turk J Hematol*, 2013;30:122-128

SCHANZ, J, 2012 **New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid, Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge**, *Journal of clinical oncology*; **30:820-829**.

SHAFFER, L.G.; BEJANI, B.A., 2004 **A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays**. *Hum. Reprod. Update*; v. 10, p. 221-226.

SHAFFER, L.G.; TOMMERUP, N. (Org),2005. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature**. 6ed. Basel, Karger, 130 p.

SHEN, *et al*, 2018, **Detection of genome-wide copy number variants in myeloid malignancies using next-generation sequencing**, *J Clin Pathol* 2018;71:372-378

SILVA, J. A. P. 2012, Estudo citogenético em neoplasias e lesões proliferativas ósseas. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu.

SINCLAIR, E.J., *et al*, (1998) **Trisomy 15 associated with loss of the Y chromosome in bone marrow: a possible new aging effect**, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 105, 20–23.

SOUTO, A.P. Comportamento Citogenético Anômalo em Indivíduos Portadores da Doença de Darier. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará. 2012.

SOUZA, D.H. Estudo citogenético da região 7q11.23 – A Síndrome de Williams-Beuren. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Botucatu. 2010.

STROM, S. S *et al*, 2005. **Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study**. *Leukemia* 19(11):1912-8

TICIANELLI, J. S.; *et al*, 2011 **Intersexo e outras anomalias do desenvolvimento do aparelho reprodutor nos animais domésticos e o auxílio da citogenética para o diagnóstico**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte. Jan/mar; v.35, n.1, p.26-32.

TOPÁZIO, B.A. Aspectos Clínicos e Genéticos da Síndrome de Williams-Beuren: Revisão de Literatura. Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Biologia da Universidade Federal Bahia – Salvador.2013

UTSCH & BOECHAT, 2017, **Síndrome mielodisplásica: revisão de literatura**, *Revista da saúde*, jan/jun 08(1) suplemento: 86-87

YANG W, *et al* (2010). **FISH analysis in addition to G-band karyotyping: utility in evaluation of myelodysplastic syndromes?** *Leuk Res*; 34: 420-25.

YOSHIDA, M.D. 1993, **The Oncologist Psycian Education**, *The Oncologist*;1:284-287

ZHANG, X, *et al*, 2010. **Rapid and multiple in situ identification and analyses of physiological status of specific bacteria based on fluorescent in situ hybridization**. *Journal of bioscience and bioengineering, Okayama*, v. 110, n. 6, p. 716-719.

ZILINA, O, *et al*, 2014, **Chromosomal microarray analysis as a first-tier clinical diagnostic test: Estonian experience**. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2014; 2(2):166-175.

ZIPURSKY, *et al*, 1994, **Interphase Cytogenetic Analysis of In Vivo Differentiation in the Myelodysplasia of Down Syndrome**, *Blood*, Vol 84, no 7 (October 1), 1994: pp 2278-2282

8.1 - Anexo I. Modelo do questionário aplicado aos pacientes com SMD.



**IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÕES GENÔMICAS RARAS EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E COM CARIÓTIPO SEM ALTERAÇÕES
NUMÉRICAS E/OU ESTRUTURAIS**

QUESTIONÁRIO

PACIENTE:

DATA: / / .

1 – O paciente tem diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica.

() Sim.

() Não. Qual o Diagnóstico?.....

2 – Sexo do paciente (a)?

() Masculino.

() Feminino.

3 – Idade do paciente (a)? anos.

4 – O paciente (a) esta recebendo algum tipo de tratamento?.

() Sim. Quais?.....

() Não.

5 – O paciente tem ou teve exposição ocupacional a agrotóxicos?

() Sim.

() Não.

6 – O paciente (a) tem algum tipo de citopenias no sangue periférico ?

() Sim. () Leucopenia () Plaquetopenia () Eritropenia

() Não.

7 – Qual a porcentagem de Blastos na medula óssea do paciente (a)?.....%.

Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC-GOIAS / LaGene – Laboratório de Citogenética
Humana e Genética Molecular / Lacen – Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni
Cyeneiros / SES-GO.

Av. Universitária, 1069 – Setor Leste Universitário – CEP. 74605-010 – Goiânia – Goiás.

Tel: (0xx62) 3946-1385.

8.2 - Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido



IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÕES GENOMICAS RARAS EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E COM CARIÓTIPO SEM ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E/OU ESTRUTURAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável: **Cristiano Luiz Ribeiro**

Nome (Sujeito da Pesquisa):.....

RG/Certidão de Nascimento:.....

Naturalidade:.....

Endereço.....

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo sob o título: **IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÕES GENOMICAS RARAS EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E COM CARIÓTIPO SEM ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E/OU ESTRUTURAIS**, cujo o objetivo consiste em utilizar testes genéticos para contribuir com o tratamento médico da doença no sangue conhecida como Síndrome Mielodisplásica.

Meu nome é **Cristiano Luiz Ribeiro** e sou o pesquisador responsável, Doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade. Em caso de dúvidas, poderá entrar em contato comigo pelos telefones: Fixo – (62) 3946 1385. Celular – (62) 984612665.

A inclusão dos pacientes no presente estudo obedecerá aos seguintes critérios: Pacientes com esta doença no sangue e que apresentem o resultado de um teste genético normal, existência de informações nos prontuários como sexo, idade e as quais tratamento estão sendo submetidos. Os indivíduos considerados controles neste estudo não deverão apresentar esta doença no sangue, devem apresentar informações como idade, sexo, quando e a quais tratamentos já haviam ou estão sendo submetidos. Serão Excluídos da participação neste estudo, todos os pacientes que não preencherem os critérios mínimos descritos acima. A participação na entrevista e a doação da amostra de sangue serão voluntárias. Os participantes, no momento da entrevista com o pesquisador responsável, devem assinar este termo de consentimento livre e esclarecido. A participação no referido estudo será no sentido de permitir a doação voluntária de amostra de sangue para colaborar com o tratamento médico.

Fui alertado da pesquisa a se realizar, e que posso esperar alguns benefícios, tais como: **Contribuição com o tratamento médico para esta doença, sendo mais eficiente, precoce**

e específico para mim e estou ciente ainda, que estes estudos já foram realizados e podem ser eficazes, evitando assim possíveis riscos. Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos em decorrência da coleta do sangue ou da medula óssea pelo médico assistente. Poderei sentir uma dor leve a moderada, em decorrência da aplicação da agulha. Estou ciente de que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado, ou elemento, que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em total sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento sem precisar justificar, e que não sofrerei qualquer prejuízo a assistência que venho recebendo do médico assistente. No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Eu....., RG....., abaixo assinado, discuti com o pesquisador (Cristiano Luiz Ribeiro) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidades e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço. Goiânia, de..... de 201....

(Assinatura do Paciente)

(Assinatura do Pesquisador Responsável) Cristiano Luiz Ribeiro

8.3 - ANEXO III PROTOCOLO PARA EXECUÇÃO DA CULTURA CELULAR

Procedimentos

1. Reagentes e materiais

1. Meio de cultura RPMI 1640 (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47);
2. 100µL de L-Glutamina 1640 (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47);
3. 100µL de Fitohemaglutinina (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47);
4. 1mL de Meio Completo para Medula óssea 1640 (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47) ;
5. Micropipetas automáticas 200 e 1000 µL ou de 10mL;
6. Tubos de 15 mL;
7. Garrafa de Cultura;
8. KCl.(gaveta G18), acrescentar o KCl á água deionizada em proporção pré-determinada conforme quantidade que se deseja preparar.
9. Carnoy, proporção 3 X 1: 3mL de metanol e 1 mL de ácido acético
10. Racks ou suporte para os tubos.

2. Equipamentos

1. Estufa CO2 Sample port, modelo 150-400
2. Agitador de Tubos
3. Centrifuga Beckman Gpr
4. Capela de fluxo laminar câmara de fluxo laminar da Veco

3. Amostras

1. As amostras de sangue após coletadas com heparina são transferidas para as garrafas de culturas já enriquecidas com os meios de cultura importantes para o crescimento e multiplicação celular. O meio de cultura é composto por: 4 ml RPMI 1640, 1 mL de soro fetal bovino, 100 µL de Fitohemaglutinina e 100 µL de L- Glutamina, sendo 1,5 mL das amostras de sangue acrescentadas em seguida. Após preparar as amostras identificar sempre a parte lateral do frasco com o número de identificação e iniciais do paciente e colocar na estufa de CO2 Sample port, modelo 150-400 por 47h.

4. Hipotonização e lavagem do material

1. 47horas depois, retirar os frascos de garrafas de cultura da estufa de CO2 Sample port, modelo 150-400 e colocar 75µL de Colchicina em cada frasco, ressuspender o

material e devolver à estufa por 30 min;

2. Retirar os frascos de garrafa de cultura da estufa, ressuspender o material e verter seu conteúdo num tubo falcon de 15mL;

3. Centrifugar a 1000 rpm na centrífuga Beckman Gpr por 10 min;

Depois de centrifugar, aspirar o sobrenadante com um pipeta de pasteur (deixar 1 mL) e acrescentar 10mL de solução hipotônica (KCl 0,75M) com um pipeta de pasteur (ate a marca de 11mL do tubo);

4. Levar para a estufa de CO₂ Sample port, modelo 150-400, por 35 min;

Passados os 35min, retirar o tubo (falcon de 15mL) da estufa e acrescentar solução fixadora (carnoy 3:1) até completar 14mL do frasco de falcon de 15mL;

4. Aguardar 10min a temperatura ambiente;

5. Centrifugar a 1000rpm por 10 min na centrífuga Beckman Gpr;

6. Aspirar ao sobrenadante com a pipeta de pasteur (deixa cerca de 1mL), adicionar lentamente pela parede do frasco (falcon de 15mL) 10mL de solução fixadora (desmanchar os grumos), levar à centrífuga Beckman Gpr novamente. As lavagens deverão ser realizadas ate a solução ficar transparente (mínimo 3X);

7. Guardar em Geladeira (Boch Glass Line refrigerador 47) até fazer as lâminas.

5. Preparação de lâminas

1. Deve-se limpar muito bem pelo menos cinco lâminas com solução álcool etílico a 70%;

2. Identifica-las com o código correspondente a cada caso, no momento do uso, molhar as lâminas com água destilada e coloca-las em banho-maria a 37°C.

3. Homogeneizar a solução de células e gotejar 3 gotas usando a micropipeta de 250 µL sobre a lâmina em banho-maria.

4. Secar a lâmina em temperatura ambiente e observar no microscópio investido se há a presença de metáfases.

8.4 - ANEXO IV

PROTOCOLO PARA EXECUÇÃO DE FISH (HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU*)

1ª Etapa: Preparação da lâmina para co-denaturação

1-Escolhe-se uma região na lâmina (já preparada conforme citogenética convencional),

onde se encontre material apropriado para a reação, preferencialmente regiões onde se encontre vários núcleos interfásicos e com metáfase.

2-Marca-se a região escolhida no mapa. Armazena as lâminas em geladeira (2-8°C) overnight.

3-Efetuar desidratação da lâmina, passando-a pelas seguintes soluções:

- a. Alcool 70% por 1 minuto
- b. Alcool 85% por 1 minuto
- c. Alcool 100% por 1 minuto

4-Deixa a lâmina secar.

5-Aplicar a sonda na região demarcada anteriormente (2ul).

6-Cobre-se a sonda com lamínula 24x24m, limpa e desengordurada. A partir da aplicação da sonda a lâmina deve ficar protegida da luz.

7-Hibridação: coloca-se a lâmina no hibridizador (Hybrite) obedecendo a seguinte programação:

- a. Desnaturação por 3 minutos a 75°C
- b. Anelamento por 22 horas a 37°C

Obs: colocar água nas laterais do Hybrite.

2ª Etapa: Lavagem e aplicação da contra-coloração (DAPI)

1-Preparar as soluções de lavagem.

2-Ajustar a temperatura do banho-maria em 72°C e colocar as soluções de lavagem em um Falcon 50ml.

3-Retirar a lâmina do hibridizador ao abrigo da luz.

4-Retira-se a lamínula arrastando-a com a pinça e mergulha na solução 1 por 2 minutos.

- 5-Retira-se a lâmina, deixa escorrer o excesso e então mergulha na solução 2 por 1 minuto.
- 6-Deixa secar a lâmina.
- 7-Aplicar 10ul do contraste (DAPI).
- 8-Cobrir a gota com lamínula evitando o aparecimento de bolhas.
- 9-Aguardar por 10 minutos.
- 10-Capturar as imagens.